

细菌生物被膜检测与分析方法

刘宝宝¹ 汪洋^{1*} 易力² 王慧芳¹ 王瑜欣¹ 官胜龙¹ 涂春田¹

(1. 河南科技大学动物科技学院 畜禽分子病原与免疫学重点实验室 河南 洛阳 471003)

(2. 洛阳师范学院生命科学学院 河南 洛阳 471022)

摘要: 细菌生物被膜(Biofilm, BF)由物体表面集聚生长的微生物群落和自身分泌的胞外物质构成,是造成细菌产生多重耐药性的原因之一。可靠、简单和快速的BF检测方法有助于有效预防和治疗相关疾病。基于不同原理的检测与分析方法已广泛用于BF研究中,本文从生物学方法、物理方法和化学方法等方面对BF检测方法进行总结,重点阐述显微镜技术在BF检测中的应用。并介绍了近年来发展的拉曼光谱、质谱成像、MALDI-TOF-MS等新技术,同时比较其优点和局限性,以便研究者找到最合适和最新的研究方法。

关键词: 生物被膜, 检测方法, 显微镜技术, 优点, 局限性

Detection and analysis methods of bacterial biofilm

LIU Bao-Bao¹ WANG Yang^{1*} YI Li² WANG Hui-Fang¹ WANG Yu-Xin¹
GONG Sheng-Long¹ TU Chun-Tian¹

(1. College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China)

(2. College of Life Science, Luoyang Normal University, Luoyang, Henan 471022, China)

Abstract: Bacterial biofilms (BF) are surface-attached communities of cells embedded in an extracellular polymeric matrix. The cells are composed of polymers produced by the microorganisms themselves. Biofilm is a cause of multidrug resistance. A simple, reliable, quick biofilm analysis method facilitates the effective prevention and treatment of infectious diseases. In recent years, numerous methods for analyzing biofilm based on various principles have been developed. In this review, common microbiological, physical, and chemical methods of biofilm analysis are summarized, with a focus on the application of microscopy methods. New technologies such as Raman spectroscopy, imaging mass spectroscopy, and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight analysis are being applied in biofilm research. Accordingly, this review highlights the advantages and limitations of several methods with a view to assisting scientists in

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2018YFD0500100); National Natural Science Foundation of China (31772761, 31540095); Natural Science Foundation of Henan Province (182300410047, 162300410067)

*Corresponding author: Tel: 86-379-64282431; E-mail: wangyocan@163.com

Received: November 13, 2017; **Accepted:** February 01, 2018; **Published online** (www.cnki.net): February 13, 2018

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0500100); 国家自然科学基金(31772761, 31540095); 河南省自然科学基金(182300410047, 162300410067)

*通信作者: Tel: 86-379-64282431; E-mail: wangyocan@163.com

收稿日期: 2017-11-13; **接受日期:** 2018-02-01; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-02-13

determining the most appropriate and up-to-date methods for their continued research.

Keywords: Biofilm, Analysis methods, Microscopy method, Advantage, Limitation

细菌生物被膜(Biofilm, BF)由物体表面集聚生长的微生物群落和细胞外以及自身分泌的基质构成^[1]。在自然界中,任何细菌在成熟条件下都能以BF形式存在,并且可出现于包括自然的、人工的及宿主体内环境的任何生态系统中^[2]。BF的形成是一个复杂的过程,主要包括黏附、增殖、聚集、成熟和分离几个主要阶段^[3-4](图1)。细菌BF状态被认为是细菌适应恶劣环境而形成的一种保护模式。BF对抗生素及宿主的免疫反应不敏感,导致感染性疾病迁延不愈,浪费大量的人力及物力,形成了公共卫生问题^[5]。因此,可靠、简单和快速的检测方法有助于预防和治疗BF引起的相关疾病。基于不同原理的检测方法已广泛用于BF的研究^[6],其优点和局限性见表1。本文重点阐述显微镜技术在BF检测中的应用,并介绍近年来发展检测BF的新技术如:拉曼光谱、质谱成像和MALDI-TOF-MS等,以便研究者找到最合适和最新的研究方法。BF的检测方法主要有生物学方法、物理或化学方法、显微镜技术以及近年来发展的检测细菌BF新技术。

1 生物学方法

1.1 96孔微量板定量检测法

微量板定量检测法用于定量检测BF的形成能力,用稀释倍数来量化细胞适用于每个微生物

实验室研究^[7]。此方法常与光学显微镜结合来定量和定性评估BF的形成能力和耐药性^[8]。Chavant用一种固定化的磁珠放入培养基中形成BF,收集磁珠后用特定的公式来定量计算生物被膜,这种方法已经被用于研究BF形成的动态规律和基质成分^[9]。

1.2 定量聚合酶链式反应(qPCR)

定量聚合酶链式反应(Quantitative PCR, qPCR)是细菌BF的定量分析方法。这种方法由于存在游离细胞外DNA(eDNA)和死细胞DNA的影响,其测定值可能大于实际值^[10]。为了不计算活细胞之外DNA,样品可以在DNA提取前用叠氮溴化丙锭(Propidium monoazide, PMA)处理^[11]。PMA只进入膜受损的细胞并与eDNA相互作用^[12],提取过程中修饰过的DNA在qPCR期间不会扩增^[13]。因此PMA-qPCR可用于精确计算BF中活细胞的数量和定性分析单个细菌群落的BF^[14]。

2 物理方法

通过干重或湿重可以间接测量BF生物量。Trulear用干燥载玻片与BF之间的重量差计算BF生物量和体积密度^[15]。还可以将细胞的表面进行涡旋,用过滤后释放的组分来计算BF生物量^[16]。因为没有从表面去除整个BF,并且小分子可以通过过滤器,所以可能低估BF生物量。

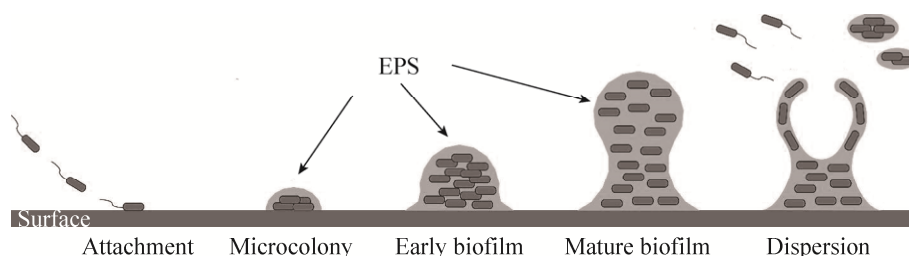


图1 细菌生物被膜的形成过程

Figure 1 The formation of bacterial biofilm

注: EPS: 胞外聚合物.

Note: EPS: Extracellular polymeric substances.

表 1 BF 的测量方法
Table 1 Measurement methods of bacterial biofilm

类型 Types	方法 Method	应用 Application	优点 Advantages	局限性 Limitations
生物学方法 Microbiological methods	96 孔微量板定量 检测法	定性细菌形成 BF, 结合染色法定量 BF 的形成能力 基于靶向 DNA 片段的扩增, 间接评估细胞总数	定量检测, 适用所有实验室, 同时处理大批样品 快速, 量化不同物种的 BF	由于边缘液体易挥发导致测定值过高 昂贵, 高估细胞数量
	PMA-qPCR	使用 PMA 预处理样品, PCR 评估活细胞数	快速, 只能量化活细胞, eDNA 不会干扰	只基于 BF 细胞的完整性进行评估
物理方法 Physical methods	重量	通过干重或湿重间接测量 BF 生物量	易执行, 不需昂贵的设备	耗时, 灵敏度低, 准确度低
	电化学阻抗谱	基于电化学反应 BF 的间接测量	非破坏性方法, 实时和原位观察	由于 BF 异质性导致数据难以解读
	超声时域反射计	通过声阻抗间接测量 BF 生物量和厚度	非破坏性方法, 实时和原位观察	特殊异质 BF 难测量, 薄的 BF 灵敏度低
化学方法 Chemical methods	CV 染色法	通过 CV 染色间接测定 BF 生物量	用于不同细菌种类, 高通量, 不需去除 BF	重复性差, 敏感性差, 无固定标准
	试卤灵试验	通过化学还原染料间接测量 BF 代谢活性	耗时少, 便宜, 无毒, 可以通过分光荧光测定	检测限低, 难以用于多菌种 BF(代谢率不同)
	EPS 提取	分析 EPS 组合物	解密 EPS 的糖和蛋白质组成	有细胞内含物污染
	基于 ESP 磷脂测量 BF	通过定量 ESP 磷脂间接测量活细胞	适用于广泛范围的微生物, 可估计其活力	耗时, 灵敏度低, 对脂质污染敏感
	CLSM + FLBA	检测和分析 EPS 多糖组成	解密糖的空间分布和 EPS 的组成	荧光探针成本高
	抗 EPS 抗体	检测并定位 EPS 结构	特异性高, 需定位 EPS 特定成分	成本高

2.1 电化学阻抗谱(Electrochemical impedance spectroscopy, ECIS)

电化学阻抗谱用于研究细菌 BF 电化学系统, 间接评估细菌 BF 生物量^[17]。ECIS 通过检测氧化还原溶质扩散系数的变化, 记录在电极上测量的电化学反应。电极上氧化还原溶质(示踪剂)的反应取决于局部传质系数, 随着 BF 厚度增加, 示踪剂电流逐渐降低, 利用数码相机可以直接观察 BF。

2.2 超声时域反射计

超声时域反射计是用于测量 BF 厚度的物理方法^[18]。从 BF 一侧界面测量的声阻抗差值得到 BF 厚度。Schultz 等测量了边界层流动中平均湍流速度的分布, 并报道了 BF 厚度与表面摩擦系数之间的相关性^[19]。另一种方法是用直接和间接测量生物污染的组合监测器, 在热交换器单元中监测流体输送

特性, 通过摩擦阻力和传热阻力的数学计算来实现 BF 检测^[20]。

3 化学方法

化学方法是一种检测细菌特定 BF 组分的间接方法, 利用能够吸附结合到 BF 组分上的荧光染料测量特定组分。用于研究 BF 的化学方法有很多, 除了下面介绍的方法之外还有 Syto9/PI 染色法、荧光二乙酸试验、1,9-二亚甲基蓝试验和色氨酸定量试验^[21]。

3.1 结晶紫(Crystal violet, CV)染色法

结晶紫染色是最常用的定量检测细菌 BF 的化学方法^[22]。这个方法可染色活细胞、死细胞以及存在于 BF 基质中的一些成分, 从而非常合适量化总 BF 生物量, 用于各种 BF 形成的测定。本课题组通过该方法鉴定了猪链球菌 BF 并筛选出 BF 形成能力

强弱菌株^[23-26]。

3.2 比色法

3.2.1 XTT/TTC 试验

比色法用于测量细菌 BF 组分含量,原理是将特定底物的细胞代谢物转化成可用分光光度计测定的有色产物。Koban 研究试剂 3,3'-[1-(苯氧基)-3,4-四氮唑]-二(4-甲氧基-6-硝基)苯磺酸钠 (XTT),被活菌代谢为甲瓞^[27]。最近使用优化了的另一种四唑盐 TTC (2,3,5-氯化三苯基四氮唑)来量化 BF 中细菌的代谢活性^[21]。

3.2.2 试卤灵(Resoruffin)试验

刃天青又称阿尔玛蓝,是一种稳定的氧化还原指示剂,通过代谢活细胞被还原成试卤灵,用于量化 BF 的代谢活性^[28]。刃天青和 CFU 计数得到的结果之间具有良好的相关性^[29]。应用 BF (非浮游)细胞获得的数据建立标准曲线。同时可以用新鲜培养基与刃天青钠盐一起添加到 BF 上,更准确地量化 BF 活性。不同细菌代谢刃天青的速率不同,因此难以应用多微生物菌落。

4 显微镜技术

BF 生物量和细胞活力可以通过显微镜来观察。在表 2 展现了几种显微镜方法的优点和缺点。光学显微镜技术是形成视觉观察 BF 的基本技术。de Carvalho 使用光学显微镜对 BF 结构和生物量进行了研究^[30]。

激光共聚焦扫描显微镜 (Confocal laser scanning microscopy, CLSM) 用于观察 BF 的空间结构^[31]和形态差异。本课题组通过此方法观察到猪链球菌在体外能够形成 BF 并观察到 BF 的形态^[32]。此方法还可以用特异性的荧光探针(常用核酸染料 SYTO-9 和 SYBR-Green 标记^[33])进行 BF 的 CLSM 成像。CLSM 可以用于分析胞外聚合物 (Extracellular polymeric substances, EPS) 的分布和原位表征,结合荧光凝集素来检测分析 EPS 碳水化合物,多糖化合物及其在 BF 内的分布^[34]。CLSM 可以与特异性细胞荧光探针结合,获得 EPS 分布的 3-D 图像^[35],

结合特异性抗体可以检测 BF 中一些特定的胞外多糖纤维束。荧光原位杂交 (Fluorescence in situ hybridization, FISH) 或衍生的方法可以在多物种 BF 的条件下分析种间的竞争和干扰,确定 BF 形成的关键分子决定簇^[36]。可以利用 CLSM 分析 BF 中死亡的细胞,观察 BF 中局部细胞死亡及其调控机制^[37],并评估多种抗微生物制剂对 BF 活力的影响^[38]。Davison^[39]提出了观察杀菌剂对革兰阳性菌 BF 作用方式的间接标记程序, Bridier 将此方法扩展到革兰阴性菌^[40]。

扫描电子显微镜 (Scanning electron microscope, SEM) 提供了关于空间结构的信息并且能够检测 EPS 的存在^[41]。SEM 方法已经用于细菌和真菌 BF 的定量测定^[42],同时还可以评估 BF 的表型特征^[43]。我们采用 HE 染色和扫描电镜观察,发现猪链球菌在斑马鱼体内呈细菌聚集趋势,发现了类似于“BF”样的细菌集簇^[32]。利用此方法分析野生株和 *luxS* 缺失株 BF 的图像,为进一步分析链球菌中 *luxS* 的功能和 BF 形成和毒力的关键作用奠定了基础^[44]。冷冻扫描电镜 (Cryo-scanning electron microscope, Cryo-SEM) 允许在冷冻水合状态下保存 BF,观察 BF 的内部结构,揭示细菌如何相互连接。环境扫描电镜 (Environmental scanning electron microscope, ESEM) 可以在高放大倍数下进行观察含水和非导电的活菌 BF,不受人为操作对样品形态破坏和假象产生的影响^[45]。聚焦离子束扫描电子显微镜 (Focused ion beam scanning electron microscope, FIB-SEM) 是一种用于探索 BF 内部结构的工具。通过称为“切片和视图”的过程获得 3-D 重建,并通过软件连续获得图像切片以重建 3-D 模型。原子力显微镜 (Atomic force microscope, AFM) 用于在非破坏性条件下纳米至微米尺度上对生物样品的成像。用于确认通过定量 (活细胞计数, CV 染色) 或其他成像 (光学显微镜, SEM) 技术获得的结果。在检查的样品表面特征中,来自 AFM 图像可以定量 BF 生物量^[46]。

表 2 显微技术应用于 BF 的研究
Table 2 Microscopy techniques applied to the study of biofilms

显微镜技术 Microscopy technique	应用 Application	优点 Advantages	局限性 Limitations
光学显微镜 Light microscopy	形成视觉识别, 定量评估, 与透射	样品制备简单, 便宜, 容易操作, 样	放大倍数和分辨率有限, 部
CLSM	电子显微镜或 SEM 组合使用	品成像范围大	分样品需要染色, 缺乏细节
	观察 BF 空间结构, 分布, 抗生素	观察 BF 的空间结构, 样品的 3-D 图	需要荧光团, 观察的分子数量
	对细胞活力的影响	像, 无需计算机处理	有限, 荧光探针, 天然荧光的
			干扰
SEM	BF 空间结构研究, 评估抗生素药	分辨率高, 能够成像复杂的形状, 放	样品制备繁琐, 会破坏样品
	物的作用, 形成 BF 动力学评估	大倍数大	结构, 缺乏垂直分辨率
Cryo-SEM	表面结构, 内部的结构细节(冻结	分辨率高, 需在完全水合状态下观察,	分辨率低, 样品可能溶化,
	断裂), 液体, 半液体和光束敏感	样品制备简单快速, 破坏少	设备昂贵
	样品		
E-SEM	自然状态下成像, 原位和实时动态	BF 完整, 无需预处理, 在水合和非导	湿样品分辨率低, 样品可能
	研究	电中观察	损伤
FIB-SEM	BF 内部结构, 3D 结构, 研究环境	不容易产生假象, 研究 BF 内部结构	需要真空, 离子束损坏会降低分辨率
	BF		
AFM	确认其他技术获得的结果, 确定	无破坏性, 预处理少, 原位成像, 提	观察范围小, 测量会带来样
	BF 粘附力, 强度, 原位成像	供表面 3D 图像	品损伤

5 近年来发展的检测细菌 BF 方法

5.1 基于拉曼光谱技术分析 BF 胞外物质

拉曼光谱技术用于检测 BF 基质的化学成分和组成^[47], 探索细菌细胞壁的精细结构^[48], 研究 BF 的空间结构^[49], 具有快速、准确、无损鉴定和检测的优势。Venkata 等^[50]首次运用拉曼光谱检测到了大肠杆菌 BF 状态下高水平的亮氨酸, 研究表明亮氨酸促进了大肠杆菌生物被膜的形成。拉曼光谱技术和扫描电子显微镜(SEM)结合可以用于分析细菌浮游状态和生物被膜状态下核酸、碳水化合物和蛋白质的差异, 区分同物种细胞之间的生理特性^[51]。

5.2 基于质谱成像(Imaging mass spectrometry, IMS)技术分析 BF 化学成分的空间分布

质谱成像技术是一种基于质谱分析, 用于检测待测样品空间分布的分子成像技术^[52], 具有多分子水平、多分子种类、高灵敏度同时检测的优点。在此技术上发展的飞行时间二次离子质谱技术(Time-of-flight secondary ion mass spectrometry, TOF-SIMS)用于观察 BF 基质组分如蛋白质、多糖

和脂质的特征片段和空间分布^[53], 具有高灵敏度和分辨率的优势。

5.3 基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱鉴定 BF 生物大分子

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)是一种新型软电离方法, 用于测定 BF 生物大分子和有机小分子化合物的分子量, 鉴定 BF 表面的蛋白质。具有快速、操作简单、谱图直观的特点^[54]。Pereira 等使用 MALDI-TOF-MS 方法首次在聚丙烯表面上监测铜绿假单胞菌 BF 的形成过程, 结果表明此方法不仅能够区分 BF 形成的不同阶段, 而且适用于指示 BF 分散释放的时间, 指出 MALDI 分析可能会成为 BF 形成和控制的临床诊断和预后处理的有前景工具^[55]。

6 小结与展望

在自然界中, 任何细菌在成熟条件下都可以形成 BF, 90%以上的微生物是以 BF 形式生存生长的^[2]。美国疾病控制预防中心专家估计大于 65%的

人类细菌感染与 BF 有关^[56], 这提示如果能有效预防控制 BF 感染, 在临床感染治疗中有重要意义, 同时也使 BF 研究成为一个热门的领域。随着科研水平的提高, 传统的鉴定方法已经不能满足 BF 的研究, 迫使我们需用更全面、更先进、更快速的技术和方法研究 BF。而我们常规的 BF 研究方法操作复杂、敏感性和特异性差, 远远不能满足早期快速鉴定的需要^[57]。只有利用各种先进的技术和方法进行 BF 深入而全面的研究, 我们才能得到客观、准确的鉴定结果, 加快抗菌药物的研发, 减少 BF 带来的感染和工业、食品污染, 为临床治疗生物膜引起的感染提供帮助。

上述各种技术和方法可以从不同方面研究 BF 的复杂结构, 建议采用综合方法来获得更具体和精确的 BF 生物量和活力。部分化学方法与显微镜技术结合, 可以共同解析 BF 的组分及结构。可以通过细菌 ESP 测量来定量检测 BF 生物量^[58]。使用水解多糖的多种分析技术获得 BF EPS 的碳水化合物组成, 同时可以使用蛋白质组学方法探索 BF 蛋白质多样性^[59], 还可以通过 ESP 磷脂进行细菌 BF 检测分析。此外, 动物体内 BF 模型的建立和鉴定也越来越受到重视, 细菌以 BF 形式存在于动物体内可能是其致病的重要原因^[60-61]。通过 SEM 和 AFM 可以直接量化生物量, 虽然理论上的优势偏向于间接方法, 但是分析的成本和耗时限制了其在大规模上的应用。另外, 大部分 BF 的研究方法停留在静态的观察中, 期望能有新的技术实现 BF 形成过程中的动态观察。同时, 研究 BF 的成分是通过物理分离, 这会破坏细胞和 BF 之间的空间结构。截至目前, 在活细胞中观察 BF 的相关功能区域和其相互作用还很困难, 期待有新的方法和技术解决这个难题, 以便更好地研究 BF。

REFERENCES

- [1] Dufour D, Leung V, Lévesque CM. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance[J]. *Endodontic Topics*, 2010, 22(1): 2-16
- [2] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections[J]. *Science*, 1999, 284(5418): 1318-1322
- [3] Abdullahi UF, Igwenagu E, Muázu A, et al. Intrigues of biofilm: A perspective in veterinary medicine[J]. *Veterinary World*, 2016, 9(1): 12-18
- [4] Wang Y, Yi L, Fan HJ, et al. Progress in several important animal pathogens biofilm formation[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2014, 34(10): 1693-1698 (in Chinese)
汪洋, 易力, 范红杰, 等. 几件重要动物病原菌生物被膜形成的研究进展[J]. *中国兽医学报*, 2014, 34(10): 1693-1698
- [5] Wang Y, Wang YX, Sun LY, et al. *Streptococcus suis* biofilm: regulation, drug-resistance mechanisms and disinfection strategies[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, DOI: 10.1007/s00253-018-9356-z
- [6] Zhang X, Zhang XG, Dang YS, et al. Bacterial biofilm preparation and detection methods[J]. *Chinese Journal of Postgraduates of Medicine*, 2014, 37(25): 67-71 (in Chinese)
张秀, 张晓刚, 党永生, 等. 细菌生物膜制备及其检测方法的研究进展[J]. *中国医师进修杂志*, 2014, 37(25): 67-71
- [7] Ceri H, Olson ME, Stremick C, et al. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37(6): 1771-1776
- [8] Müsken M, Fiore SD, Römling U, et al. A 96-well-plate-based optical method for the quantitative and qualitative evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and its application to susceptibility testing[J]. *Nature Protocols*, 2010, 5(8): 1460-1469
- [9] Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, et al. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 68(3): 605-612
- [10] Klein MI, Scott-Anne KM, Gregoire S, et al. Molecular approaches for viable bacterial population and transcriptional analyses in a rodent model of dental caries[J]. *Molecular Oral Microbiology*, 2012, 27(5): 350-361
- [11] Yasunaga A, Yoshida A, Morikawa K, et al. Monitoring the prevalence of viable and dead cariogenic bacteria in oral specimens and *in vitro* biofilms by qPCR combined with propidium monoazide[J]. *BMC Microbiology*, 2013, 13: 157
- [12] Nocker A, Sossa KE, Camper AK. Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 70(2): 252-260
- [13] Nocker A, Mazza A, Masson L, et al. Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, 76(3): 253-261
- [14] Chen NT, Chang CW. Rapid quantification of viable legionellae in water and biofilm using ethidium monoazide coupled with real-time quantitative PCR[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(2): 623-634
- [15] Trulear MG, Characklis WG. Dynamics of biofilm processes[J]. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 1982, 54(9): 1288-1301
- [16] Jackson S, Coulthwaite L, Loewy Z, et al. Biofilm development by blastospores and hyphae of *Candida albicans* on abraded denture acrylic resin surfaces[J]. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 2014, 112(4): 988-993

- [17] Dominguez-Benetton X, Sevdá S, Vanbroekhoven K, et al. The accurate use of impedance analysis for the study of microbial electrochemical systems[J]. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41: 7228-7246
- [18] Sim STV, Suwarno SR, Chong TH, et al. Monitoring membrane biofouling via ultrasonic time-domain reflectometry enhanced by silica dosing[J]. *Journal of Membrane Science*, 2013, 428: 24-37
- [19] Schultz MP, Swain GW. The effect of biofilms on turbulent boundary layers[J]. *Journal of Fluids Engineering*, 1999, 121(1): 44-51
- [20] Trueba A, Egufá E, Río-Calonge B, et al. Combined monitor for direct and indirect measurement of biofouling[J]. *Biofouling*, 2008, 24(2): 75-86
- [21] Chen CX. Qualitative and quantitative research methods of bacterial biofilm[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2016(9): 2177-2180 (in Chinese)
陈朝喜. 细菌生物被膜定性和定量研究方法[J]. *湖北农业科学*, 2016(9): 2177-2180
- [22] Hui LY, Li J, Zhu MX, et al. Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by antimicrobial peptide 17BIPHE2[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(4): 872-880 (in Chinese)
回丽媛, 李军, 朱明星, 等. 抗菌肽 17BIPHE2 对金黄色葡萄球菌生物被膜的抑制作用[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(4): 872-880
- [23] Wang Y, Yi L, Zhang ZC, et al. Biofilm formation, host-cell adherence, and virulence genes regulation of *Streptococcus suis* in response to autoinducer-2 signaling[J]. *Current Microbiology*, 2014, 68(5): 575-580
- [24] Wang Y, Yi L, Wang SH, et al. Crystal structure and identification of two key amino acids involved in AI-2 production and biofilm formation in *Streptococcus suis* LuxS[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e138826
- [25] Wang Y, Yi L, Zhang FQ, et al. Identification of genes involved in *Mycoplasma gallisepticum* biofilm formation using mini-Tn4001-SGM transposon mutagenesis[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 198: 17-22
- [26] Wang Y, Yi L, Zhang ZC, et al. Overexpression of *luxS* cannot increase autoinducer-2 production, only affect the growth and biofilm formation in *Streptococcus suis*[J]. *Scientific World Journal*, 2013, 2013: Article ID 924276
- [27] Ramage G. Comparing apples and oranges: considerations for quantifying candidal biofilms with XTT [2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide] and the need for standardized testing[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2016, 65(4): 259-260
- [28] O'Brien J, Wilson I, Orton T, et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267(17): 5421-5426
- [29] van den Driessche F, Rigole P, Brackman G, et al. Optimization of resazurin-based viability staining for quantification of microbial biofilms[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2014, 98: 31-34
- [30] de Carvalho CCCR, Da Fonseca MMR. Assessment of three-dimensional biofilm structure using an optical microscope[J]. *BioTechniques*, 2007, 42(5): 616-620
- [31] Bridier A, Briandet R. Contribution of confocal laser scanning microscopy in deciphering biofilm tridimensional structure and reactivity[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2014, 1147(1147): 255-266
- [32] Wang Y. Study on the mechanism of biofilm formation and molecular pathogenesis of *Streptococcus suis*[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2011 (in Chinese)
汪洋. 猪链球菌生物被膜形成及致病机理研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2011
- [33] Neu TR, Lawrence JR. Advanced techniques for in situ analysis of the biofilm matrix (structure, composition, dynamics) by means of laser scanning microscopy[A]/Donelli G. *Microbial Biofilms. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, Vol. 1147[M]. New York, NY: Humana Press, 2014: 43-64
- [34] Turonova H, Neu TR, Ulbrich P, et al. The biofilm matrix of *Campylobacter jejuni* determined by fluorescence lectin-binding analysis[J]. *Biofouling*, 2016, 32(5): 597-608
- [35] Zhang RY, Neu TR, Zhang YT, et al. Visualization and analysis of EPS glycoconjugates of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2015, 99(17): 7343-7356
- [36] Bridier A, Briandet R, Bouchez T, et al. A model-based approach to detect interspecific interactions during biofilm development[J]. *Biofouling*, 2014, 30(7): 761-771
- [37] Guilbaud M, Piveteau P, Desvaux M, et al. Exploring the diversity of *Listeria monocytogenes* biofilm architecture by high-throughput confocal laser scanning microscopy and the predominance of the honeycomb-like morphotype[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(5): 1813-1819
- [38] Doroshenko N, Tseng BS, Howlin RP, et al. Extracellular DNA impedes the transport of vancomycin in *Staphylococcus epidermidis* biofilms preexposed to subinhibitory concentrations of vancomycin[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58(12): 7273-7282
- [39] Davison WM, Pitts B, Stewart PS. Spatial and temporal patterns of biocide action against *Staphylococcus epidermidis* biofilms[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, 54(7): 2920-2927
- [40] Bridier A, Briandet R, Thomas V, et al. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review[J]. *Biofouling*, 2011, 27(9): 1017-1032
- [41] Hung C, Zhou YZ, Pinkner JS, et al. *Escherichia coli* biofilms have an organized and complex extracellular matrix structure[J]. *mBio*, 2013, 4(5): e00645-13
- [42] Kumar D, Banerjee T, Chakravarty J, et al. Identification, antifungal resistance profile, *in vitro* biofilm formation and ultrastructural characteristics of *Candida* species isolated from diabetic foot patients in Northern India[J]. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 2016, 34(3): 308-314
- [43] Ceresa C, Tessarolo F, Caola I, et al. Inhibition of *Candida albicans* adhesion on medical-grade silicone by a *Lactobacillus*-derived biosurfactant[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, 118(5): 1116-1125
- [44] Wang Y, Zhang W, Wu ZF, et al. Functional analysis of *luxS* in *Streptococcus suis* reveals a key role in biofilm formation and virulence[J]. *Veterinary Microbiology*, 2011, 152(1/2): 151-160

- [45] Pompilio A, De Nicola S, Crocetta V, et al. New insights in *Staphylococcus pseudintermedius* pathogenicity: antibiotic-resistant biofilm formation by a human wound-associated strain[J]. BMC Microbiology, 2015, 15: 109
- [46] Danin PE, Girou E, Legrand P, et al. Description and microbiology of endotracheal tube biofilm in mechanically ventilated subjects[J]. Respiratory Care, 2015, 60(1): 21-29
- [47] Chao YQ, Zhang T. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) revealing chemical variation during biofilm formation: from initial attachment to mature biofilm[J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2012, 404(5): 1465-1475
- [48] Samek O, Al-Marashi JFM, Telle HH. The potential of Raman spectroscopy for the identification of biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*[J]. Laser Physics Letters, 2010, 7(5): 378-383
- [49] Marcotte L, Barbeau J, Lafleur M. Characterization of the diffusion of polyethylene glycol in *Streptococcus mutans* biofilms by Raman microspectroscopy[J]. Applied Spectroscopy, 2004, 58(11): 1295-1301
- [50] Venkata HNN, Nomura N, Shigeto S. Leucine pools in *Escherichia coli* biofilm discovered by Raman imaging[J]. Journal of Raman Spectroscopy, 2011, 42(11): 1913-1915
- [51] Henry VA, Jessop JL, Peeples TL. Differentiating *Pseudomonas* sp. strain ADP cells in suspensions and biofilms using Raman spectroscopy and scanning electron microscopy[J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2017, 409(5): 1441-1449
- [52] Bleich R, Watrous JD, Dorrestein PC, et al. Thiopeptide antibiotics stimulate biofilm formation in *Bacillus subtilis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(10): 3086-3091
- [53] Ding YZ, Zhou YF, Yao J, et al. *In situ* molecular imaging of the biofilm and its matrix[J]. Analytical Chemistry, 2016, 88(22): 11244-11252
- [54] Stingu CS, Rodloff AC, Jentsch H, et al. Rapid identification of oral anaerobic bacteria cultivated from subgingival biofilm by MALDI-TOF-MS[J]. Journal of Oral Microbiology, 2008, 23(5): 372-376
- [55] Pereira FDES, Bonatto CC, Lopes CAP, et al. Use of MALDI-TOF mass spectrometry to analyze the molecular profile of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on glass and plastic surfaces[J]. Microbial Pathogenesis, 2015, 86: 32-37
- [56] Potera C. Forging a link between biofilms and disease[J]. Science, 1999, 283(5409): 1837-1839
- [57] Hu JS, Chen HT, Zhang J, et al. Advances in the common identification methods of bacterial biofilm[J]. Chinese Veterinary Science, 2010, 40(11): 1194-1199 (in Chinese)
胡锦涛, 陈豪泰, 张杰, 等. 细菌生物被膜鉴定方法的研究进展[J]. 中国兽医科学, 2010, 40(11): 1194-1199
- [58] Dall L, Herndon B. Quantitative assay of glycocalyx produced by viridans group streptococci that cause endocarditis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1989, 27(9): 2039-2041
- [59] Lilledahl MB, Stokke BT. Novel imaging technologies for characterization of microbial extracellular polysaccharides[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 525
- [60] Wang Y, Yi L, Shi MY, et al. Establishment and application of animal bacterial biofilm model in vivo: CN, CN102669017A[P]. 2012 (in Chinese)
汪洋, 易力, 史明艳, 等. 一种体内细菌生物被膜感染动物模型的构建方法: 中国 CN102669017A[P]. 2012-09-19
- [61] Wang Y, Yi L, Cheng XC, et al. Establishment and application of bacterial biofilm model in animals[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2013, 35(11): 946-949 (in Chinese)
汪洋, 易力, 程相朝, 等. 动物体内细菌生物被膜模型的建立及应用[J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(11): 946-949